

University of Groningen

## Precision-cut intestinal slices as an ex vivo model to study NSAID-induced intestinal toxicity

Niu, Xiaoyu

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2014

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Niu, X. (2014). *Precision-cut intestinal slices as an ex vivo model to study NSAID-induced intestinal toxicity*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [S.n.].

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# Appendices

---

Samenvatting

Acknowledgements

List of Publications

Curriculum Vitae

---

## Samenvatting

Precision-cut intestinal slices (PCIS, precies-gesneden dunne plakjes darmweefsel) zijn recent ontwikkeld als een *ex vivo* model van de darm. Ze bevatten alle celtypes die in een darm normaalgesproken ook aanwezig zijn, ingebed in de natuurlijke extracellulaire matrix. In eerder onderzoek was al aangetoond dat de activiteit van enzymen en transporteiwitten, die betrokken zijn bij de dispositie van geneesmiddelen, op fysiologisch niveau behouden blijft gedurende 8 tot 24 uur incubatie. Omdat de toxiciteit van lichaamsvreemde stoffen het resultaat is van interactie tussen verschillende soorten cellen en omdat metabolisme en transport voor een belangrijk deel de concentratie van deze stoffen in de cellen bepalen, zijn slices bij uitstek geschikt om geneesmiddelentoxiciteit *ex vivo* te bestuderen. PCIS kunnen geprepareerd worden uit elke regio van de darm, zodat gradiënten in de activiteit van geneesmiddel metaboliserende enzymen en transporteiwitten over de gehele lengte van de darm bestudeerd kunnen worden. Deze gradiënten zijn voor de toxicologie van belang, omdat ze bepalen in welke mate de epitheelcellen in de darm (de enterocyten) in de verschillende regio's blootgesteld worden aan deze geneesmiddelen en hun metabolieten. Voor het PCIS model kan darmmateriaal gebruikt worden van verschillende diersoorten en mensen, wat kan bijdragen aan het aantonen en ophelderen van verschillen in toxiciteit tussen dieren en de mens. Bovendien kan darmtoxiciteit van geneesmiddelen op deze manier direct in de mens bestudeerd worden, waarmee complexe en soms foutieve extrapolatie van dier naar mens voorkomen kan worden. **Hoofdstuk 1** geeft een overzicht van de beschikbare literatuur over het gebruik van PCIS als *in vitro* model.

Op dit moment staat de toepassing van PCIS voor het evalueren van het metabolisme, transport en toxiciteit van geneesmiddelen stoffen nog in de kinderschoenen. Daarom is in dit proefschrift de toepasbaarheid van PCIS in het onderzoek naar geneesmiddelentoxiciteit onderzocht. De focus lag hierbij op de non-steroïdale anti-inflammatoire geneesmiddelen (NSAIDs) als modelstoffen, omdat bekend is dat deze stoffen zowel in de mens als in proefdieren darmtoxiciteit veroorzaken. Als eerste werd hiervoor de stof diclofenac gebruikt (DCF), omdat deze stof in vergelijking met andere NSAIDs de meest onderzochte stof is. Het doel was om te onderzoeken of de bekende toxische mechanismen van DCF ook in de PCIS optreden (**hoofdstuk 3**). In eerdere studies was aangetoond dat de lokale toxiciteit in de darm door DCF en de hierdoor veroorzaakte pathogenese het resultaat is van verschillende zowel naast elkaar lopende als opeenvolgende processen ("multi-hit proces"). Zo veroorzaakt blootstelling aan DCF cellulaire stress door de interactie van elektrofiële metabolieten van DCF (die uitgescheiden door de lever via de gal de darm bereiken of gevormd zijn in de darm zelf) met cellulaire macromoleculen. Verder veroorzaken DCF en/of DCF metabolieten verstoring van de functie van het endoplasmatisch reticulum (ER stress), schade aan de mitochondriën en oxidatieve stress. Al deze stress factoren samen leiden tot celdood. In **hoofdstuk 3** werd aangetoond dat in de PCIS al deze processen plaatsvinden als gevolg van blootstelling aan DCF. Zo bleek dat de gen expressie van twee genen die betrokken zijn bij

ER stress (heat shock protein 70 en binding immunoglobulin protein) op-gereguleerd was. Ook was caspase 9 geactiveerd (een indicatie van mitochondriële schade), was de glutathion concentratie in de PCIS verlaagd en de gen expressie van heme oxygenase 1 (HO-1) gestegen (een indicatie van oxidatieve stress). Bovendien werden eiwit adducten gevonden die gevormd waren door covalente binding van door PCIS geproduceerde elektrofile metabolieten van DCF (een indicatie van elektrofile stress), maar de vitaliteit van de slices bleek hierdoor niet beïnvloed.

Daarnaast werd in **hoofdstuk 3** de toxiciteit van verschillende NSAIDS *in vivo*, *in vitro* en *ex vivo* vergeleken. Het bleek dat de rangschikking van deze stoffen op basis van hun toxiciteit *ex vivo* (diflunisal > diclofenac = indomethacin > naproxen >> aspirin) precies overeenkwam met die gevonden in *in vitro* systemen (geïsoleerde hepatocyten, gist en geïsoleerde mitochondriën). De rangschikking kwam ook redelijk goed overeen met *in vivo* data van de rat, met alleen diflunisal als uitzondering. Het feit dat de slices de bekende toxische mechanismen van DCF goed reflecteerden en dat bovendien de rangschikking op basis van toxiciteit goed voorspeld kon worden bevestigde dat de PCIS geschikt zijn als model om toxiciteit in de darm te onderzoeken.

Eiwit adduct formatie door reactieve metabolieten van DCF wordt algemeen beschouwd als de belangrijkste oorzaak van DCF toxiciteit in de darm. Eerdere studies in ratten hebben aangetoond dat DCF acylglucuronides, gevormd in de lever en uitgescheiden in de darm via de gal, waarschijnlijk verantwoordelijk zijn voor darmtoxiciteit na covalente binding aan eiwitten in de enterocyten. Of dit mechanisme ook een rol speelt in de mens, is onbekend, voornamelijk omdat er geen goede *in vitro* methoden bestaan voor het bestuderen ervan in humaan weefsel. Omdat metabolietvorming in *ex vivo* geïncubeerde humane PCIS gedurende 24 uur behouden blijft, veronderstelden wij dat humane PCIS zeer geschikt zouden kunnen zijn om toxiciteit gerelateerd aan het metabolisme van DCF in de menselijke darm te onderzoeken. Bovendien konden wij, door de PCIS *ex vivo* te kweken in afwezigheid van de invloed van DCF metabolisme in de lever, bepalen in hoeverre het metabolisme in de darm zelf verantwoordelijk is voor de toxiciteit van DCF. In **hoofdstuk 4** werden daarom darmslices geprepareerd uit het jejunum van 18 patiënten die een Pylorus-Preserving Pancreaticoduodenectomy hadden ondergaan. Deze PCIS werden vervolgens geïncubeerd met verschillende concentraties DCF. DCF in concentraties hoger dan 400µM was toxisch voor de darmslices, wat bleek uit verlaagde ATP concentratie in de slices, veranderingen in de morfologie, caspase 3 activatie en het lekken van lactaat dehydrogenase uit de cellen. Het bleek dat humane PCIS veel meer DCF metabolieten vormden dan PCIS van de rat en drie belangrijke DCF metabolieten en door hen gevormde eiwitadducten werden gevonden. Een aantal belangrijke observaties in deze studie leidde echter tot de conclusie dat niet de reactieve metabolieten, maar DCF zelf verantwoordelijk was voor de gevonden toxiciteit: Ten eerste werd toxiciteit aangetoond bij vergelijkbare concentraties van DCF in de PCIS van al de donoren, terwijl het DCF metabolisme enorm varieerde tussen deze donoren en werd er

geen correlatie gevonden tussen de mate van metabolisme en de toxiciteit. Ten tweede werden er veel meer DCF metabolieten gevormd als PCIS werden geïncubeerd met een lage DCF concentratie (100 $\mu$ M) dan met een hoge concentratie (400 $\mu$ M), terwijl 100 $\mu$ M DCF niet toxisch was. Tenslotte bleek co-incubatie met remmers van de meest belangrijke metabolisme routes niet te beschermen tegen DCF toxiciteit, terwijl metaboliet formatie wel aantoonbaar geremd was.

Een belangrijk voordeel van het gebruik van een *ex vivo* model van de darm is dat de invloed van de lever (en dan vooral de levermetabolieten) geëlimineerd kan worden. In eerdere studies werd aangetoond dat ratten die deficiënt zijn in de expressie van Mrp2 (Mrp2<sup>-</sup> ratten), ongevoelig zijn voor darmtoxiciteit van DCF, waarschijnlijk doordat er geen transport van in de lever gevormde toxische metabolieten naar de darm kan plaatsvinden. In **hoofdstuk 5** van dit proefschrift werd dit mechanisme verder onderzocht. Hiervoor werden PCIS geprepareerd uit de darmen van wild type en Mrp2<sup>-</sup> ratten en werden stukjes weefsel uit deze darmen in een Ussing Chamber systeem geplaatst om het transport van DCF en metabolieten over de darm te bestuderen. Het bleek dat hogere concentraties DCF nodig waren om toxiciteit te veroorzaken in PCIS afkomstig van darmen van de Mrp2<sup>-</sup> ratten dan in die van de wild type ratten. Deze lagere gevoeligheid kon gerelateerd worden aan een lagere opname van DCF in de darmen van de Mrp2<sup>-</sup> ratten, maar leek niet gerelateerd aan andere consequenties van de mutatie, zoals veranderingen in Mrp3 en BCRP transport eiwit expressie, verlaagde glutathion concentratie en verlaagd DCF metabolisme. Hoewel dus eerder was geconcludeerd dat de verminderde gevoeligheid van Mrp2<sup>-</sup> ratten voor DCF volledig was toe te schrijven aan de verminderde excretie van levermetabolieten naar de darm via de gal, konden wij met de gebruikte experimentele opzet aantonen dat deze resistentie op zijn minst ten dele veroorzaakt wordt door verminderde opname van DCF in de darmen van deze ratten. Bovendien bleken behaalde resultaten in deze studie consistent met die uit de studie beschreven in **hoofdstuk 4**, waaruit bleek dat niet de reactieve DCF metabolieten maar DCF zelf verantwoordelijk was voor darmtoxiciteit.

Hoewel PCIS van rattendarmen gedurende 8-24 incubatie uur vitaal blijven blijkend uit het behoud van een intacte epitheliale belijning, metabolisme en transport eiwit activiteit, is de levensduur toch aanzienlijk korter dan die van slices van de lever (tot 96 uur). In **hoofdstuk 6** werd na 5-24 uur incubatie van PCIS van de rat aangetoond dat ATP concentraties verlaagd waren, de morfologische structuur beschadigd was, er meer reactieve zuurstof species gevormd waren en dat de expressie van stress gerelateerde genen (HO-1, IL-6 en TNF $\alpha$ ) verhoogd was vergeleken met vers geprepareerd darmweefsel. Deze bevindingen tonen aan dat de slices wellicht stress ondervinden die veroorzaakt wordt door ischemie en reperfusie tijdens de preparatie en het incuberen van de slices. Het is bekend dat de darm zeer gevoelig is voor deze vorm van cellulaire stress. In dit hoofdstuk werden ischemische en H<sub>2</sub>S pre-conditionering toegepast als strategie om de verlaagde vitaliteit in PCIS te voorkomen. Deze methoden waren eerder al succesvol gebleken bij het voorkomen van ischemie-

reperfusie stress *in vivo*. Ondanks dat oxidatieve stress en de pro-inflammatoire reactie van de PCIS (IL-6 en TNF $\alpha$ ) gereduceerd leek te worden als gevolg van de behandelingen, leidde dit niet tot een verbetering van de vitaliteit in ons *ex vivo* systeem.

De resultaten beschreven in dit proefschrift laten zien dat er soortgebonden verschillen bestaan in de mate van metabolisme en toxiciteit van NSAIDs. Bovendien is aangetoond dat in de slices de cellulaire processen die betrokken zijn bij de toxiciteit van deze stoffen actief zijn. Verder is gebleken dat humane PCIS DCF in grote mate metaboliseren, maar dat dit niet de oorzaak is voor de lokale toxiciteit van deze stof in het jejunum. Door ratten te gebruiken die deficiënt zijn in de expressie van Mrp2 konden we de gevolgen van deze mutatie op de toxiciteit en dispositie van DCF bestuderen zonder de invloed van de lever, en het bleek dat de verminderde opname van deze stof in de mutante ratten deels de verlaagde gevoeligheid voor de toxiciteit van DCF in deze dieren kon verklaren.

Alles bij elkaar genomen hebben de studies die beschreven zijn in dit proefschrift aangetoond dat PCIS een waardevol translationeel model zijn voor het onderzoeken van het mechanisme van geneesmiddel geïnduceerde toxiciteit in de darm *ex vivo*. Het gebruik van PCIS van humane en dierlijke oorsprong kan bijdragen aan een betere voorspelling van geneesmiddelentoxiciteit en aan de vermindering van het verbruik van proefdieren. Het in een vroeg stadium van onderzoek vaststellen van de verschillen tussen mens en proefdier op dit gebied, kan mogelijk bijdragen aan een efficiëntere geneesmiddelontwikkeling.

## Acknowledgements

Almost five years ago, the second day after my birthday party, a flight brought me from Beijing to the Netherlands. After that I have spent 4.5 years in Groningen, the little town in the North Pole of the Netherlands. This has been an amazing time, filled with great people, full of challenges and adventures. Now it is time to say thanks to all the people that contributed not only to this thesis directly, but also made Groningen a sweet home for me.

First of all, I would like to express my gratitude to my supervisor, Prof. Geny Groothuis for accepting me as a PhD student in the group, and your supervision, guidance and support in these years. Dear Geny, as a researcher, I respect your meticulous scholarship, enthusiastic working attitude, and creative thinking. As a student, I am grateful for your motivation, understanding and support. You were there with me when I went to the first international conference, had my first poster, did my first oral presentation. You were always there to answer my questions in time, to correct my manuscript at 22:00 in the weekend. You were also there when I had tax problems and when I had confusions about life issues. I will remember the time with you on the airplane to the US, on the train to Interlaken, on the ferryboat to Ameland, in the hotel of Schiphol airport and all the Friday afternoons in your office. I am so lucky to meet you in my life, thank you for all the positive power you have passed to me.

Dr. Inge de Graaf, my daily supervisor and good friend, thank you for your supervision, valuable discussions and critical comments. I appreciate the time and effort you spent in reading and correcting my manuscript even when the children were sitting on you. Sorry for the time I took from them. Thank you for your warm comfort during the difficult delivery of the first publication and when I had a hard time due to moving...

I would like to express acknowledgments to my reading committee: Prof. dr. N.P.E. Vermeulen, Prof. dr. H.W. Frijlink, and Prof. dr. G. Dijkstra. Thank you for your willingness to read and review my thesis.

I would like to acknowledge the financial support of the Ubbo Emmius scholarship, University of Groningen for my doctoral research. Going abroad opened my mind and changed my life. I also acknowledge the Graduate School GUIDE for the financial support of the courses, conferences and my research stay in Japan. Special thanks to the Dutch Society for Toxicology (NVT) for supporting me to attend conferences in the UK, the US and Switzerland.

I would like to extend my acknowledgement to Prof. Dr. Klaas Poelstra, Dr. Hans Proost, Dr. Leonie Belaars, Dr. Angela Casini and Dr. Barbro Melgert for your valuable discussions and suggestions during research meetings. Leonie, thank you for your help with

the immunohistochemical staining photos. Angela, I enjoy all the lunches, parties with you, good luck with your career, being an enthusiastic, charming, sexy and sunny professor forever.

My special thanks go to Dr. Amit Taneja, Dr. Peter Horvatovich and Dr. V. Fidler for their valuable discussion and work on the statistics in this thesis. I also acknowledge the surgeons of the University Medical Centre Groningen for providing the human tissue samples.

Miriam, my dear technician, it was always nice to have you around when doing experiments. Your peaceful attitude calmed me down when I was exhausted by the work. You worked so hard and independently which always made me believe you would become a successful PhD. Thank you for helping me filling in the yearly tax form and with countless small details in the life. I also enjoyed a lot of visiting your family every Christmas holiday.

Mackenzie, Inge W and Marjolijn, my dear officemates. From research to life, from isolating RNA, making posters, preparing presentations to making traveling plans, finding nice BF, it was always good to discuss with you to hear your wise ideas. Thank you for the nice time I had with you.

Dear Andreia and Viktoriia, my angels, although you have difficult names and until now most of the times I spell them wrongly, thank you for appearing in my life. Thank you for dragging me to the gala, to Paris; to introduce me all the hairstyles, nice clothes, food, and plants. You are so important because you made me much happier, prettier and wiser. I like you two kind, beautiful and smart girls, and I like to be your friend forever.

Bo and Hongjuan, my dear sisters, I can not remember how many times I went to you with empty stomach, with emotional mood, with happiness to share, with questions regarding life puzzles or a photoshop graph. Words are short to express my gratitude. You took care of me as the sister, the days that we laugh and cry together are a treasure in my memory.

Shu, my brother, you are a surprise in my career and life. I still remember that on the way to the SOT conference, Geny and you were talking about science and culture. I sat beside you and tried to note down all the exciting ideas you mentioned in a piece of tissue. You were joking that maybe I can go to Japan to learn more, this joke came true after a few months. My words are short to express my gratitude about your care when I was in Japan, the supervision in the lab, the bike, the English dinner, the trip to Tokyo tower. It is great working with you with your inspiring ideas. I wish you a successful scientific career and I am so proud of you.

Sara, Sylvia, Ming, Benoit, Suresh, Sanna, Magdalena, Faya, Na, my great colleagues, thank you for your company and all the help during my PhD.



Jan, thank you for keeping the lab extremely organized, and thanks for helping me with all the financial documents. Gillian, the lovely secretary, thanks for preparing the cakes, tea, milk (of course you are more important than this). Your Irish sense of humour made us laugh a lot. I like your comments on the facebook. Marina and Marjolijn, thank you for all the help in the lab especially during the human work. Also thanks for the nice recipes of the cakes.

I would like to give special thanks to the master students who have worked with me: Kaman, Dennis, Henk, Laas, and Manuel. Thank you very much for your hard work, I enjoyed working with you and I learned a lot from you. I wish you success in your future career. Henk, I hope you can finally find your way back.

I wish to express many thanks to the present and previous staff in Division of Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting for your help, care and support. It was enjoyable chatting with you in the coffee time. I had a lot of fun in the monthly borrel, the lab day and the Christmas brunch. Many thanks to Alie, Adriana, Amirah, Bert, Catharina, Christina, Christa, Carian, Eduard, Irma, Jai, Karin, Marlies, Magdalena, Martin, Marieke, Marike, Paul, Patricia, Rose, Ruchi, Sanna, Venkatesh, Xu for being great colleagues and friends.

Thank you my badminton group friends, my Dutch coach Adriaan, I benefit a lot from your Dutch way of teaching. Thank you my English teacher Diane for all the nice chats and giving me all the books of your children. Thank you my friends in Graz, Austria, Xinghua Guo, Yulai Zhou, Paul, Tammi, Prof. Hoefler, I got a lot of love and support from you.

Liu bo, Deli, Li u Qi, Yingdan, Chen wen, Kuang-Yen Chen, Li naishi, Li jiuyi, Wu bian, Zhou qiyun... all my Chinese friends, it is so nice in Groningen, the small village of nowhere, still have chance to eat Chinese food, sing Chinese songs with you. A lot of us are of the same age, far away from home, to pursue a better future from abroad. Fate made us meet here, I am proud of being one of you.

刘春生老师，我传道，授业，解惑的恩师。您是我科研的启蒙者，学术和人格的榜样，也是我出国学习的大力支持者。遇见您是您的幸运。谢谢您对我的教诲，包容，鼓励和支持。南博师弟和各位北中医的师弟师妹们，加油。

爸爸妈妈，谢谢你们的爱。虽然我常常不是很听话，希望没有辜负你们的期望。二哥二姐，谢谢你们一次又一次接送我到机场，一次又一次成为我在北京的落脚地。远在欧洲的妹妹，谢谢你一直对我的关注。希望你坚定的面对自己的理想。

Hein, thank you for being the other half of me, thank you for compensate all the love that I missed. I love you, and very much.

## List of publications

Xiaoyu Niu, Inge A M de Graaf, Geny M M Groothuis. Evaluation of the intestinal toxicity and transport of xenobiotics utilizing precision-cut slices. *Xenobiotica*. 2013 Jan;43(1):73-83.

Xiaoyu Niu, Inge A.M. de Graaf, Miriam Langelaar-Makkinje, Peter Horvatovich, Geny M.M. Groothuis. Cytotoxicity of Diclofenac is not related to the formation of reactive metabolites in human intestine *ex vivo*. *Archive of Toxicology*, 2014, *in press*.

Xiaoyu Niu, Inge A.M. de Graaf, Miriam Langelaar-Makkinje, Geny M.M. Groothuis. Precision cut intestinal slices are an appropriate *ex vivo* model to study NSAID-induced intestinal toxicity in rats. *Toxicology in vitro*, 2014, Oct;28(7):1296-305.

Xiaoyu Niu, Inge A.M. de Graaf, Dennis van de Vegte, Miriam Langelaar-Makkinje, Shuichi Sekine, Geny M.M. Groothuis. Consequences of Mrp2 deficiency for diclofenac toxicity in rat intestine *in vitro*. *Manuscript submitted*.

## Published poster abstract

Xiaoyu Niu, Miriam Langelaar, Inge de Graaf, Geny Groothuis. The role of metabolism in diclofenac-induced intestinal toxicity in human *in vitro*. *Toxicology Letters*, 211:S115 (2012).

Xiaoyu Niu, Henk van der Bijl, Geny Groothuis, Inge de Graaf. Precision-cut intestinal slices as an *in vitro* model to predict NSAID induced intestinal toxicity. *Toxicology Letters*, 221:S157 (2013).

## Curriculum vitae

Xiaoyu Niu was born on 2nd of November 1982 in Baoding, Hebei Province, China. She finished her high school education in 2002. She had her bachelor degree in Chinese Materia Medica in Department of Pharmacy at the Beijing University of Chinese Medicine in 2006, and focussed on using analytical chemistry methods for pharmaceuticals. She completed her master in Molecular Pharmacognosy at Beijing University of Chinese Medicine in 2009, and focused on studying the gene sequence and expression level of the critical enzyme for glycyrrhizin biosynthesis in *Glycyrrhiza uralensis*. She worked as an exchange master student for 7 months in 2009 in the Department of Pathology, Medical University of Graz, Austria and learned molecular biology techniques.

In November 2009, she started her PhD project presented in this thesis in the Division of Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting, University of Groningen, under the supervision of Prof. Geny Groothuis and Dr. Inge de Graaf. During the time she was working on her PhD project, using Precision-cut intestinal slices as an *ex vivo* model to study NSAID-induced intestinal toxicity, she also completed all the courses and training required to become an European Registered Toxicologist.